

PROTEOGLYKANE DER CORNEA

EVA KELLER

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0048

Aus der Augenklinik der Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. O.-E. Lund

PROTEOGLYKANE DER CORNEA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Keller

aus

Valparaiso/Chile

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O.-E. Lund

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. U. Welsch
2. Prof. Dr. V. Herzog

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.1987

Inhaltsangabe

1. Einleitung
2. Zur Morphologie der Cornea
 - 2.1. Makroskopische Anatomie
 - 2.2. Mikroskopische Anatomie
3. Proteoglykane
 - 3.1. Topochemie und Kontrolle der Biosynthese von Proteoglykanen
4. Aufbau und Funktion der Stukturmakromoleküle der Cornea
5. Problemstellung
6. Material und Methoden
 - 6.1. Material
 - 6.2. Methoden
 - 6.2.1. Generelle Methoden
 - 6.2.2. Isolierung und Charakterisierung von cornealen Stroma-Proteoglykanen
 - 6.2.3. Immunhistologische Untersuchung der Cornea und Retina

7. Ergebnisse

7.1. Isolierung und teilweise Charakterisierung von Proteoglykanen der Schweinecornea

7.1.1. CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von Proteoglykanen

7.1.2. DEAE-Sephacel-Chromatographie der cornealen Proteoglykane

7.2. Bestimmung der Gewebslokalisierung von cornealen Proteoglykanen durch immunhistologische Untersuchungen

8. Diskussion

9. Zusammenfassung

10. Literaturliste

1. EINLEITUNG

Unter allen bindegewebigen Organen nimmt die Cornea eine Sonderstellung ein. Anders als die bekannten Bindegewebstypen wie Knorpel, Sehne etc. ist die Cornea transparent. Diese Transparenz ist das Ergebnis einer sorgfältigen Kontrolle der Fibrillenabstände der Kollagenbündel, sowie genau definierter Bindungen zwischen den Makromolekülen des Cornea-Stromas, die in allen Einzelheiten nicht genau bekannt sind.

In der klinischen Praxis treten Störungen der Cornea-Transparenz und damit Beeinträchtigungen des Visus nach accidenteller chemischer Verletzung der Cornea auf. Diese Fälle machen einen Teil des Patientengutes von ophthalmologischen Ambulanzen aus. Daneben gibt es seltenere hereditäre Erkrankungen, die mit einer Corneatrübung einhergehen.

Der genaue pathogenetische Weg, den die Cornea-Trübung nach chemischer Verletzung und im Rahmen anderer Krankheitsbilder geht, ist nicht in allen Einzelheiten bekannt. Es fehlen dem Kliniker dementsprechend auch teilweise die Möglichkeiten, eine Störung der Transparenz therapeutisch anzugehen. Zum genaueren Verständnis dieser Funktionsstörung der Cornea ist die Aufklärung der biologischen Kontrolle der Transparenz notwendig.

Hier spielen die Proteoglykane der Cornea eine herausragende Rolle. Diese ist dabei nicht mit der der Proteoglykane in anderen Geweben gleichzusetzen. Obwohl es eine Reihe von Daten über die Glykosaminoglykan-Verteilung in der Cornea gibt, so fehlen doch entsprechende Untersuchungen für die gesamten Proteoglykane, sowie eine genauere Zuordnung der Glykosaminoglykane und Proteoglykane zu den morphologisch abgegrenzten Schichten der Cornea.

In dieser Arbeit werden immunhistologische und biochemische Messungen vorgestellt, die eine Zuordnung der Proteoglykane zu den einzelnen auch lichtmikroskopisch abgrenzbaren Schichten der Cornea gestattet. Als Ergebnis dieser Untersuchungen wird ein Gesamtverteilungsmuster der Cornea-Proteoglykane postuliert.

2. ZUR MORPHOLOGIE DER CORNEA

2.1. Makroskopische Anatomie

Gemeinsam mit der Lederhaut, bildet die Cornea die fibröse Hülle, die den Augapfel umschließt. Im Gegensatz zur Sklera ist sie ein transparentes Gewebe mit glatter und glänzender Oberfläche. Sie erfüllt die Aufgabe den Eintritt und die Brechung der Lichtstrahlen zu gewährleisten. Bereits geringe pathologische Veränderungen an der Cornea haben deshalb größere Bedeutung als an anderen Schutzgeweben des Körpers.

2.2 Mikroskopische Anatomie

Im histologischen Schnitt können von außen nach innen folgende Schichten unterschieden werden: Epithel, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran, Endothel.

Epithel

Das Hornhautepithel ist ein fünf- bis sechsschichtiges Plattenepithel, das kontinuierlich in die Bindehaut übergeht und nur locker der Bowman-Membran aufliegt. Nach unten wird es durch die Basalmembran begrenzt, die elektronenmikroskopisch von der Bowman-Membran zu unterscheiden ist. Die zum Epithel gehörende Basalmembran ist sehr dünn und erreicht maximal $1/3$ der Dicke der Bowman-Membran. Da sie vom Epithel abgeschieden wird, ist eine

Regeneration möglich. Die Neubildung der Basalmembran nach pathologischen Prozessen dauert aber erheblich länger als die einfache Epithelregeneration.

Bowman-Membran

Es handelt sich um eine bindegewebige Schicht, die von zahlreichen Nervenästen durchsetzt wird. Die Bowman-Membran stellt Traumen einen stärkeren Widerstand entgegen als das Epithel, ist allerdings nicht regenerationsfähig.

Stroma

Das Stroma nimmt etwa 90% der gesamten Hornhautdicke ein. Es besteht zu über 90% aus extrazellulären Bestandteilen: kollagenen Fasern und der sogenannten "Kittsubstanz" oder "Grundsubstanz". Die kollagenen Fasern liegen in einem außergewöhnlich regelmäßigem Aufbau, in kreuzweise übereinandergeschichteten Lamellen gebündelt zusammen.

Zwischen den Lamellen liegen zwei Zellarten. Die fixen Hornhautzellen sind die eigentlich spezifischen Hornhautelemente; es handelt sich hierbei um eine spezialisierte mesenchymale Zelle, Cornea-Fibroblast, auch Keratozyt genannt. Sie ist für die Neubildung von Kollagen und Erneuerung der Grundsubstanz (Proteoglykane und Glykosaminoglykane) verantwortlich. Die zweite Zelle ist die sogenannte monozytär-histiozytäre Wanderzelle, die sich vorwiegend im Limbusbereich findet.

Descemet-Membran

Sie ist die Basalmembran des Endothels und besteht vorwiegend aus Kollagen Typ IV und Glykoproteinen (einschließlich Fibronektin).

Sie setzt pathologischen Prozessen einen oft erheblichen Widerstand entgegen. Im Gegensatz zur Bowman-Membran ist sie regenerationsfähig.

Endothel

Das Endothel besteht aus einer einschichtigen Lage abgeplatteter Zellen. Obwohl Mitosen in humanen Endothelzellkulturen bewiesen werden konnten (47), hat das Endothel nicht die Fähigkeit sich schnell genug zu reproduzieren, und muß klinisch als nicht regenerationsfähig angesehen werden. Die Descemet-Membran wird vom Endothel produziert.

3. PROTEOGLYKANE

Proteoglykane sind Kohlehydrat-Proteinverbindungen in denen eine variable Anzahl von Polysaccharidketten mit einem Proteinanteil in kovalenter Bindung verknüpft sind. Im Gegensatz zu den Glykoproteinen, bei denen die Kohlehydratkomponenten häufig aus verzweigten Oligosacchariden bestehen, an deren Aufbau mehr als zwei Monosaccharidtypen beteiligt sind, handelt es sich bei der Kohlehydratkomponente der Proteoglykane um Polysaccharide, die durch hohes Molekulargewicht, unverzweigte Linearstruktur und hohe Periodizität der konstruierenden Monosaccharidbausteine gekennzeichnet sind. Wegen ihres regelmäßigen Aufbaues aus Aminosuckern haben die Polysaccharide der Proteoglykane den systematischen Namen Glykosaminoglykane erhalten. In der Literatur ist der ältere Name Mucopolysaccharide noch verbreitet.

Glykosaminoglykane sind anionische Linearpolymere, die alternierend einen N-acetylierten (bzw. sulfatierten) Aminosucker und eine Uronsäure (bzw. Galaktose) und gegebenenfalls auch Estersulfatgruppen enthalten. Der Aufbau der periodisch sich wiederholenden Disaccharideinheiten, von denen 50 bis 1000 zu langen unverzweigten Kettenmolekülen zusammentreten, ist ein wichtiges Konstitutionsmerkmal der Glykosaminoglykane. Von den Glykosaminoglykanen sind 8 verschiedene Typen bekannt, die im Prinzip alle die gleiche Struktur besitzen, sich jedoch durch die Monosaccharidkomponenten bzw. durch ihren Sulfatgehalt und den Typ der glykosidischen Bindung der Monosaccharidreste unterscheiden. Über die Struktur der Glykosaminoglykane gibt Abb. 1 einen Überblick.

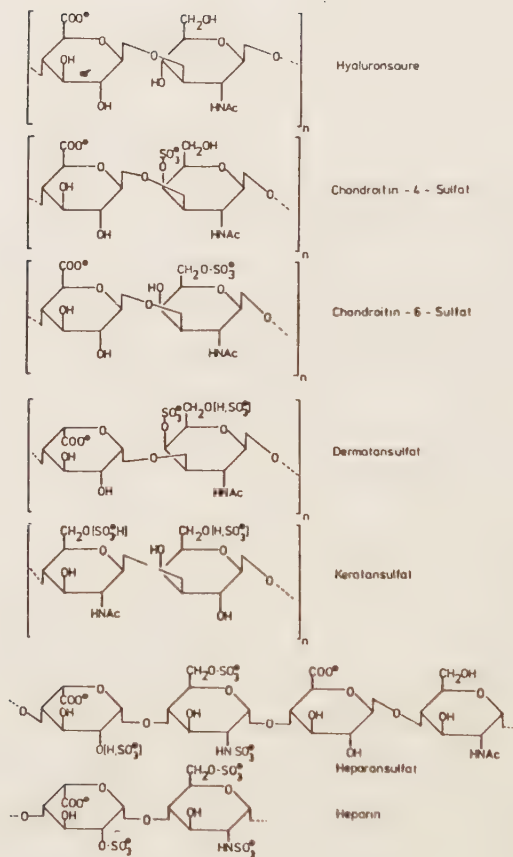


Abb. 1:

Struktur der Disaccharideinheiten der Glykosaminoglykane

Nach Buddecke 1980 (6).

Hyaluronsäure, die erstmals aus dem Glaskörper von Rinderaugen isoliert wurde (hyalos (griech.) = Glas), wird im Knorpel, im Glaskörper des Auges, in der Synovialflüssigkeit, in der Haut, in der Nabelschnur und in der Aorta gefunden. Der Polymerisationsgrad wird mit über 2000 angegeben. Die Bedeutung der Hyaluronsäure liegt in ihrer Aggregationsfähigkeit mit Proteoglykanen sowie in ihrer viskoelastischen Eigenschaft. Bis zu hundert Proteoglykan-Einheiten können pro Hyaluronsäure-Molekül gebunden werden. Diese Bindung wird wahrscheinlich durch zwei "link-Proteine" stabilisiert (22). Als solches Aggregat liegt die Hyaluronsäure im Knorpel und in anderen Geweben teilweise vor.

Die Chondroitinsulfate haben allgemein mit etwa 17 - 50.000 Dalton ein wesentlich niedrigeres Molekulargewicht als die Hyaluronsäure. Der Polymerisationsgrad, bezogen auf die Disaccharideinheiten, beträgt damit 34 - 100 gegenüber 2000 und mehr bei der Hyaluronsäure. Eine solche Disaccharideinheit besteht aus $\beta(1-4)$ -verknüpfter Glucuronsäure und $\beta(1-3)$ -verknüpftem N-Acetylgalaktosamin. Die Sulfatierung kann in 4- oder 6- Position des N-Acetylgalaktosamins erfolgen. Diese Substanz heißt dann entweder Chondroitin-4-sulfat oder Chondroitin-6-sulfat. Es kommen auch gemischte Chondroitin-4/6-sulfate und unsulfatierte Chondroitine vor. Chondroitinsulfat wurde bisher aus dem Knorpel, der Cornea, dem Knochen, der Haut und der Aorta isoliert. Es liegt immer O-glykosidisch an ein Serin-Molekül eines Coreproteins über ein Xylose-Galaktose-Galaktose-Glucuronsäure Oligosaccharid verknüpft vor. Reine Proteochondroitinsulfate konnten isoliert werden (23). Aber in den meisten Fällen ist Keratansulfat an das Coreprotein gebunden.

Dermatansulfat enthält anstelle der D-Glucuronsäure die C-5-epimere L-Iduronsäure. Es ist, wie der Name bereits andeutet, das wichtigste Glykosaminoglykan der Haut und wird in geringeren Mengen in der Cornea, im Knorpel und in der Aorta gefunden. Wie

Chondroitinsulfat ist es in den Geweben an ein Protein gebunden und liegt somit als ein Proteoglykan vor.

Keratansulfat enthält, wie seine Formel zeigt, keine Uronsäure, sondern sein Strukturelement besteht aus $\beta(1-3)$ -substituierter Galaktose und $\beta(1-4)$ verknüpftem N-Acetylglucosamin. Die Sulfatierung erfolgt in der 6-Stellung des N-Acetylglucosamins und in 6-Stellung der Galaktose. Zwei Typen des Keratansulfats sind bekannt: der corneale und der skelettale Typ. Der corneale enthält neben den Kohlehydraten der Disaccharideinheiten zusätzlich Mannose und Fucose und ist N-glykosidisch über N-Acetylglucosamin an ein Asparagin des Coreproteins gebunden (18). Von der Art der Bindungsregion (5, 7, 35) ähnelt das corneale Keratansulfat stark der Struktur N-glykosidisch gebundener Glykoprotein-Oligosaccharide vom "Komplextyp". Das skelettale Keratansulfat enthält neben den Kohlehydraten der Disaccharideinheiten zusätzlich Galaktosamin und N-Acetylneuraminsäure. Die Bindung an das Coreprotein erfolgt O-glykosidisch über N-Acetylgalaktosamin, wahrscheinlich an Threonin. Dieses Keratansulfat ähnelt somit den Glykoprotein-Oligosacchariden vom "Mucin-Typ". Der corneale Typ des Keratansulfats konnte bisher nur in der Cornea gefunden werden. Der skelettale Typ wurde aus dem Knorpel, aus den Zwischenwirbelscheiben und aus der Aorta isoliert.

Heparansulfat besteht aus alternierenden Resten von $\alpha(1-4)$ -Glucosamin, das an der Aminogruppe teils acetyliert, teils sulfatiert ist, und von $\beta(1-4)$ -Glucuronsäure oder $\alpha(1-4)$ -Iduronsäure. Heparansulfat konnte ubiquitär auf den Zelloberflächen von tierischen Geweben nachgewiesen werden. Nach den jetzigen Vorstellungen liegt Heparansulfat über eine O-glykosidische Xylose-Serin-Bindung mit dem Coreprotein verknüpft als Proteoglykan vor. Heparin ist zum größten Teil aus Strukturelementen aufgebaut, die aus $\alpha(1-4)$ verknüpften 2-Sulfamidoglucose-6-sulfat und $\alpha(1-4)$ verknüpftem Iduronsäure-2-sulfat bestehen. Es wurde, wie sein Name andeutet, ur-

sprünglich aus Leber (lat. hepar) gewonnen. Heparin wirkt der Blutgerinnung entgegen, indem es die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin und damit dessen Wirkung auf die Faktoren des Gerinnungssystems hemmt.

3.1. Topochemie und Kontrolle der Biosynthese von

Proteoglykanen

Die intrazellulär verlaufende Biosynthese der Proteoglykane läßt sich in zwei Phasen einteilen: In der ersten Phase vollzieht sich die ribosomale Synthese der kohlehydratfreien Proteinkomponente der Proteoglykane, die an das endoplasmatische Reticulum abgegeben wird. Dort erfolgt zunächst die Übertragung desjenigen Monosaccharides auf das Akzeptorprotein, das Kohlehydratkette und Proteinkomponente miteinander verknüpft. Anschließend kommt es durch schrittweise Anlagerungen der am Aufbau des Glykosaminoglykans beteiligten Monosaccharide zum Wachstum der Polysaccharidkette, wobei deren Sequenz durch die Spezifität der beteiligten Enzyme festgelegt wird. Die für die Synthese benötigten Monosaccharide werden als UDP-Monosaccharide (UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-Xyl) bereitgestellt. Während oder unmittelbar nach der Polysaccharidsynthese vollzieht sich die Umwandlung von Glucuronsäure- in Iduronsäurereste (Dermatansulfatbiosynthese) und ggf. die Übertragung von Estersulfat durch Sulfo-Transferasen. Da die Spezifität der bei der Synthese beteiligten Glykosid- und Sulfo-Transferasen zwar sehr hoch, aber nicht absolut ist, kann es zur Bildung hybrider Glykosaminoglykanseitenketten, zu unregelmäßiger Sulfatierung und variablem Molekulargewicht der Polysaccharidkette kommen. Da Dermatansulfat stets aus Chondroitinsulfat entsteht und die hierfür notwendige enzymatische Umwandlung der D-Glucuronsäure- in L-Iduronsäurereste meist nicht quantitativ erfolgt, bilden Chondroitinsulfat und Dermatansulfat häufig hybride Glykosaminoglykane, in denen sie in copolymerer Struktur innerhalb der gleichen Polysaccharidkette vorliegen.

Aus den Experimenten zur Isolierung von Membranen mit Chondroitinsulfat- und Keratansulfat-synthetisierender Aktivität und deren Identifizierung durch morphologische Aufklärung und Bestimmung der Markerenzym-Aktivitäten läßt sich als Ort der Kettenverlängerung und Sulfatierung des cornealen Keratansulfats der Golgi-Apparat der Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit festlegen. Dieses Organell war früher als rein sekretorisches Vesikel angesehen worden. Seit längerer Zeit ist aber bekannt, daß der Golgi-Apparat auch synthetische Aufgaben erfüllt. Vor allem Zellen mit hoher Syntheseleistung an Oligo- und Polysacchariden sind reich an Golgi-Membranen (12). Silbert konnte an isolierten Golgi-Membranen von Maus-Mastozytomzellen zeigen, daß dort auch die Kettenverlängerungsreaktion des Chondroitins stattfindet (63). Als Syntheseort der Bindungsregion des Chondroitinsulfats stellten Schwartz, Roden und Dorfman (59,60) das glatte endoplasmatische Reticulum heraus. Die gleiche intrazelluläre Lokalisation konnte für die Synthese der Lipidzwischenprodukte und deren Anknüpfung an das Protein gezeigt werden. Wahrscheinlich ist dies auch der Syntheseort des Bindungsregion-Oligosaccharids des Keratansulfats. Dies folgt nicht nur aus der Hemmbarkeit der Biosynthese des Keratansulfats durch Tunicamycin (21), sondern auch aus der Ähnlichkeit der Bindungsregion des Keratansulfats der Cornea mit den Asn-N-GlcNAc-verknüpften Oligosaccharidanteilen vieler Glykoproteine. Als intrazelluläre Lokalisation der Anknüpfung des Bindungsregion-Oligosaccharids kann deswegen das glatte endoplasmatische Reticulum postuliert werden. Damit ist ein Modell der kompletten Topochemie der Biosynthese des Proteochondroitinsulfats der Cornea möglich (s. Abb. 2): Nach der ribosomalen Proteinsynthese folgt die Anknüpfung des Bindungsregion-Oligosaccharids im glatten endoplasmatischen Reticulum. Die Synthese wird abgeschlossen durch Kettenstart, Kettenverlängerung und Sulfatierung im Golgi-Apparat.

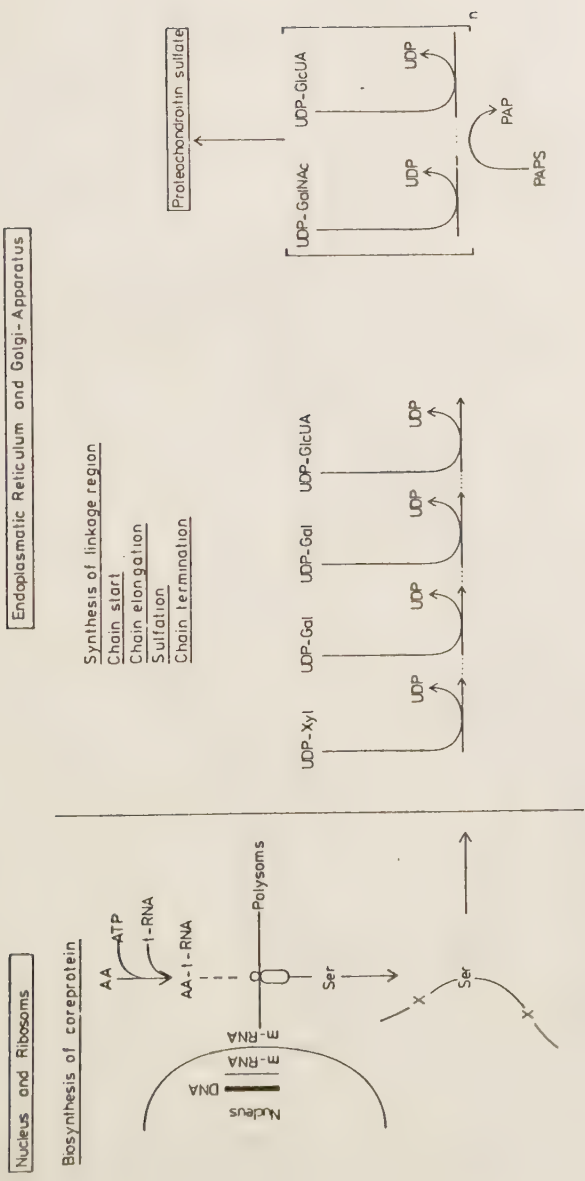


Abb. 2:
 Topochemie der Biosynthese des cornealen Proteochondroitinsulfats
 Nach Keller R. 1983 (37).

Die Art der Kettenstoppreaktion in der Biosynthese des cornealen Keratansulfates wurde genauer untersucht (36,37). Danach inhibiert die zunehmende Sulfatierung der Kette zum nicht-reduzierenden Ende hin die weitere Kondensation von Monosaccharidbausteinen. Es folgt daraus eine drastische Verlangsamung der Kettenverlängerungsreaktion ab einer gewissen Kettenlänge. Dies wiederum führt zu Biosyntheseprodukten einer relativ einheitlichen Kettenlänge und eines homogenen Sulfatierungsgrades, wie es für die biologische Funktion des Moleküls gefordert werden muß (s.u.). Ein Modell des gesamten Proteokeratansulfats ist in Abb. 3 gegeben. Einzelheiten der Modellvorstellung zu den Kontrollmechanismen in der Biosynthese des cornealen Keratansulfats sind in Abb. 4 wiedergegeben.



Abb. 3:

Strukturmodell des cornealen Proteokeratansulfats

Nach Keller R. 1981 (35).

O=Galaktose, ●=N-Acetylglucosamin, ◊=sulfatierte Galaktose,

◐=sulfatiertes N-Acetylglucosamin, ◑=Mannose, ○=Fucose.

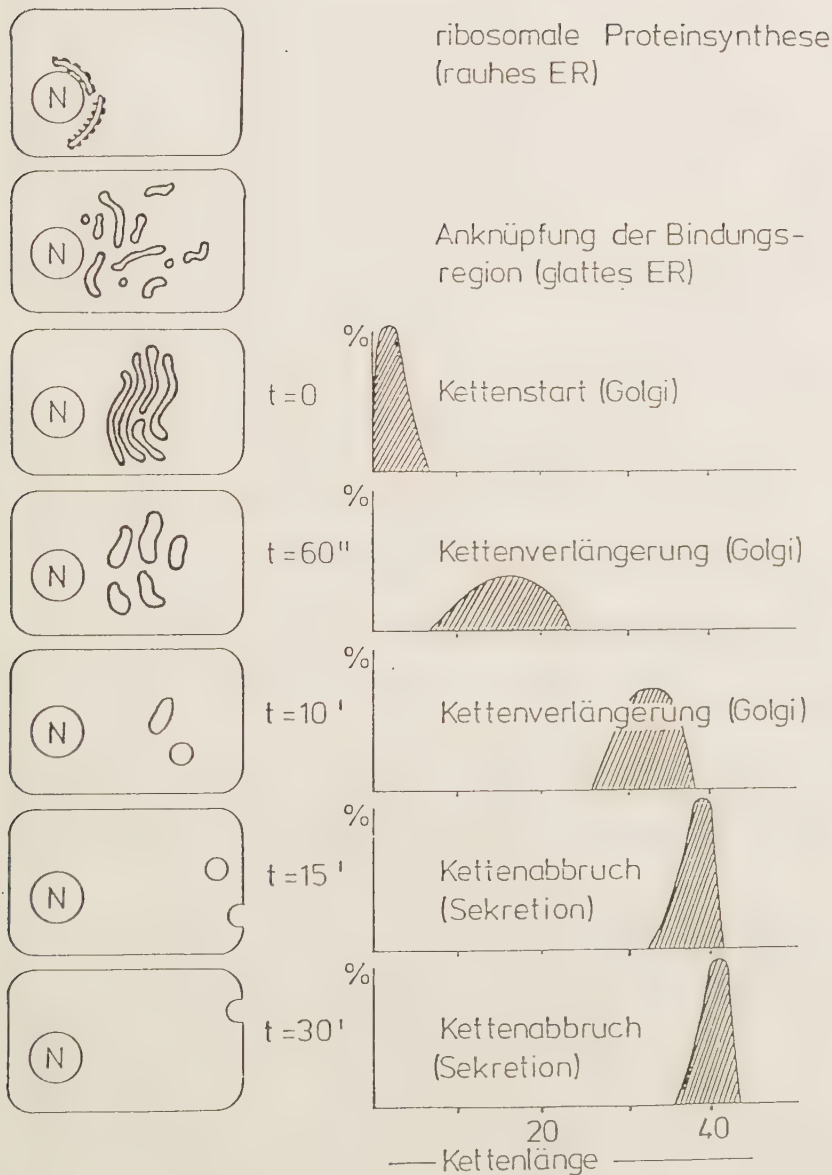


Abb. 4:

Kontrollmechanismen in der Biosynthese des cornealen Keratansul-
fats. Nach Keller R. 1983 (36).

4. AUFBAU UND FUNKTION DER STRUKTURMAKROMOLEKÜLE DER CORNEA

Die strukturelle Integrität der fünf Schichten der Cornea (Epithel, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran und Endothel) wird durch die strukturbildenden Makromoleküle aufrechterhalten. Entscheidend für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Interzellulärmatrix ist die Spezifität der Interaktion zwischen deren einzelnen makromolekularen Komponenten.

Das Corneaendothel produziert die Descemet-Membran, das Corneaepithel die Bowman-Membran. Die Substanzen des Stromas werden von den Cornea-Fibroblasten synthetisiert. Es handelt sich hierbei um eine spezialisierte mesenchymale Zelle, die ein anderes Muster an Bindegewebssubstanzen produziert als die gewöhnlichen Fibroblasten. So wird in der Cornea keine Hyaluronsäure gefunden, aber dafür ein Cornea-typisches Proteoglykan, das corneale Proteokeratansulfat, das sonst in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden konnte.

Die Funktion der Proteoglykane ist im Stroma entscheidend anders als in anderen Geweben. Dies wird schon aus der Tatsache deutlich, daß die Proteoglykane in dem Trockengewicht der Cornea nur etwa 3% ausmachen. Die mit "Hydratation", "Kittsubstanz" u. a. suggerierte Funktion für Proteoglykane in anderen Geweben entfällt schon aus diesem Grund für die Corneaproteoglykane. Während die Proteoglykane im übrigen Stütz- und Bindegewebe vor allem an der Herstellung viskoelastischer "Kissen" beteiligt sind, die die zum Teil erhebliche Gewebssdrucke (zum Beispiel im Knorpel und in der Zwischenwirbelscheibe) abfangen sollen, ist die Hauptfunktion der Corneaproteoglykane die Aufrechterhaltung der regelmäßigen Struktur der dreidimensionalen Matrix. Das corneale Proteokeratansulfat z. B. hat einen Stokes Radius, der in der gleichen Größenordnung wie der Abstand der Kollagenfibrillen liegt (unter einem Stokes

Radius wird in diesem Falle der hydrodynamisch wirksame Radius eines Makromoleküls verstanden). Auf Grund dieses Befundes wurde postuliert, daß das corneale Proteokeratansulfat unter physiologischen Bedingungen frei durch das corneale Kollagenetzwerk diffundieren kann. Bei einer Unregelmäßigkeit der Gitterabstände kann es dann zu einer Diffusionsbehinderung für das corneale Proteokeratansulfat kommen. Dies wiederum könnte in dem betreffenden Corneabezirk einen Reiz zur Auslösung eines Reparationsprozesses für die Cornea-Fibroblasten darstellen.

Cornea-Stromazellen, auch Keratozyten genannt, dedifferenzieren in Zellkulturen rasch und produzieren dann kein Proteokeratansulfat mehr, aber dafür alle, für die native Cornea untypischen, hochmolekularen Proteoglykane und Hyaluronsäure (48).

Die Transparenz der Cornea ist an das Vorhandensein der Cornea-typischen Proteoglykane gebunden. Im fetalen Zustand ist Cornea-Stroma ähnlich den anderen bekannten Bindegewebstypen und nicht transparent. Mit der Reifung der Cornea sinkt der Hyaluronsäuregehalt und steigt die Transparenz. Parallel dazu wird Proteokeratansulfat von eingewanderten Fibrozyten exprimiert (57).

Daneben enthält die Cornea zwei weitere Proteoglykane, das Proteochondroitin und das Proteochondroitinsulfat. Diese beiden Substanzen ähneln den niedermolekularen Proteoglykanen, wie sie auch in anderen mesenchymalen Geweben gefunden werden.

Die Hauptmenge des Corneakollagens entfällt auf das Kollagen Typ I, das eine identische Verteilung wie Kollagen Typ III aufweist (44). Kollagen Typ IV wurde in den Corneabasalmembranen nachgewiesen. Ebenso wurde die Existenz von Kollagen Typ V und VI im Corneagewebe gezeigt (67).

Proteoheparansulfat wurde bisher nicht in der Cornea gefunden. Da aber dieses Proteoglykan ein struktureller Bestandteil der Zelloberfläche (43) und der Basalmembran ist, muß seine Gegenwart auch für die Cornea gefordert werden.

In der Basalmembran liegt das Proteoheparansulfat in äquimolaren Konzentrationen mit den anderen Strukturmakromolekülen der Basalmembran vor: Laminin, Kollagen Typ IV und Nidogen (16). Die Struktur dieser Moleküle ist in Abb. 5 schematisch dargestellt

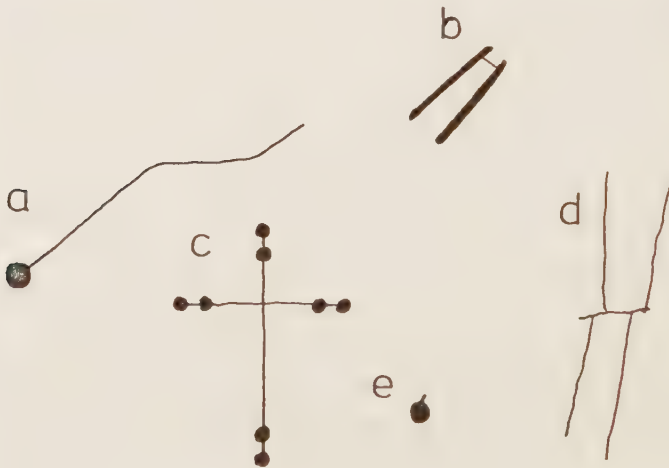


Abb. 5:

Schematische Darstellung der Größenverhältnisse der Basalmembran-Strukturmakromoleküle

a: Kollagen Typ IV; b: Fibronectin; c: Laminin; d: Proteoheparansulfat; e: Nidogen. Nach Fujiwara et al. 1984 (16).

Basalmembran-Proteoheparansulfat wurde elektronenmikroskopisch dargestellt (Abb. 6). Danach handelt es sich um ein Proteoglykan mit einem relativ kleinen Coreprotein und vier Seitenketten.

Kollagen Typ IV hat die Fähigkeit zur Selbstassoziation. Es bilden sich nach längeren Inkubationszeiten *in vitro* netzartige Überstrukturen mit einer in engeren Grenzen schwankenden Maschengrößen (Abb. 7). Es ist möglich, daß solche Strukturen auch *in vivo* das "Skelett" der Basalmembran bilden, an das sich die anderen Makromoleküle der Basalmembran binden.

Das Proteoheparansulfat der Zelloberfläche ist der mengenmäßig wichtigste Bestandteil einer äußersten Zellschicht, die histologisch als Glykokalix bezeichnet wird. Als die allgemeinste Funktion dieser Glykokalix kann sicherlich die einer "Isolationsschicht" auf der äußeren Zellmembran definiert werden. Die biologische Notwendigkeit einer solchen Schicht wird schon aus der Überlegung deutlich, daß es einen Mechanismus geben muß, der die Zellen daranhindert, zusammenzufließen und ihre Intrazellulärsubstanz auszutauschen.

Das erste Zelloberflächen Proteoheparansulfat wurde von der Gruppe von Magnus Höök beschrieben (32). Sie benutzten als biologisches Ausgangsmaterial Rattenlebern. Daraus isolierten sie ein Proteoheparansulfat, das ein Molekulargewicht von etwa 115.000 Dalton aufweist und vier Seitenketten von 15.000 - 20.000 Dalton trägt. Aus der unterschiedlichen Extrahierbarkeit ihres biologischen Ausgangsmaterial mit Heparin schlossen sie, daß es zwei verschiedene Formen der Zellassoziation ihres Proteoheparansulfates geben muß.



Abb. 6:

Elektronenmikroskopische Darstellung von Basalmembran-Proteoheparansulfat. Nach Fujiwara et al. 1984 (16).

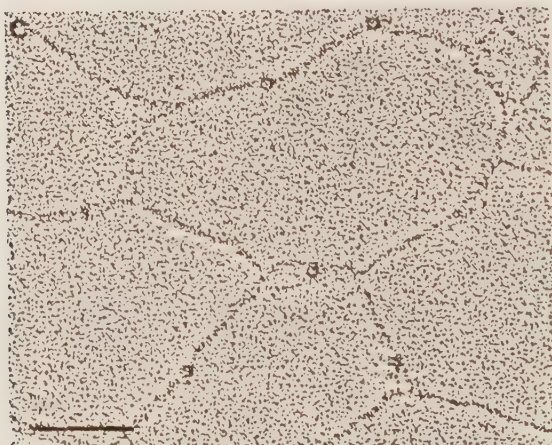


Abb. 7:

In vitro Netzbildung des Basalmembran Kollagens (Kollagen Typ IV). Nach Yurchenko et al. 1982 (71).

Nach ihren Vorstellungen bindet eine Form über die Seitenketten an einen spezifischen Heparansulfatrezeptor, während die andere Form mit dem Coreprotein in die Membran eingebettet ist (siehe Abb. 8).

Nach den jüngsten Ergebnissen dieser Gruppe liegt die Membran-assoziierte Form dabei in enger Nachbarschaft mit Cytoskeletoelementen.

Ein völlig anderes Proteoheparansulfat der Zelloberfläche wurde von der Gruppe von Lars A. Fransson für kultivierte Hautfibroblasten gefunden (8). Dieses Proteoheparansulfat liegt als Dimeres über Cysteinbrücken verknüpft vor und hat als Monomeres ein Molekulargewicht in einem ähnlichen Bereich wie das von der Höökschen Gruppe beschriebene (Abb. 9).

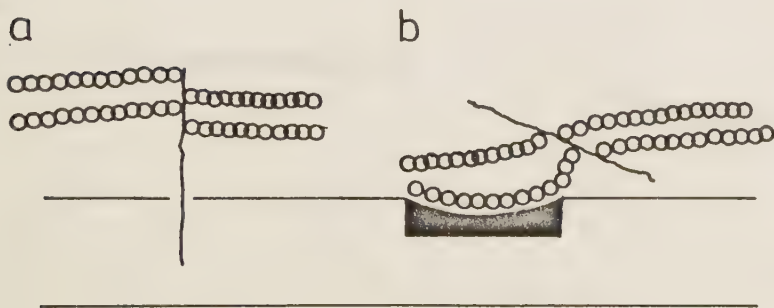


Abb. 8:

Zelloberflächen-Proteoheparansulfat

Nach Höök et al. 1984 (32).

Tab. 2

Glykosaminoglykane in der Cornea

GAG	Aminozucker	Uronsäure	Sulfat	In der Cornea
Hyaluronsäure	GlcNAc	Glucuron	-	Embryo
CS	GalNAc	Glucuron	-	Ja
CS4	GalNAc	Glucuron	Ja	Ja
CS6	GalNAc	Glucuron und Iduron	Ja	Ja
KS	GlcNAc und Gal	-	Ja	Ja
HEP	Glc und GlcNAc	Glucuron und Iduron	Ja	--
HS	Glc und GlcNAc	Glucuron und Iduron	Ja	Nicht beschrieben (bis jetzt)

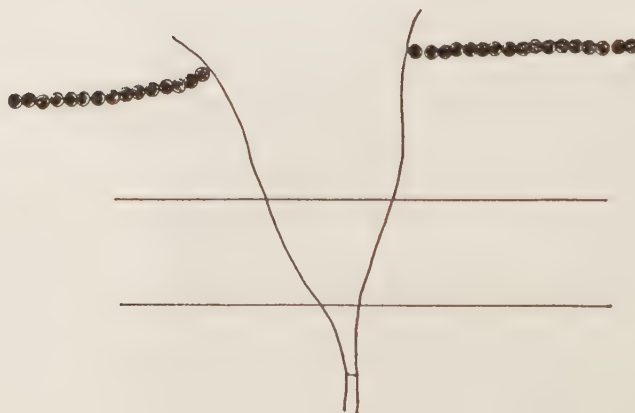


Abb. 9:

Zelloberflächen-Proteoglykane

Nach Fransson et al. 1983 (8).

5. PROBLEMSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit soll die topographische Verteilung der Proteoglykane in der Cornea für einige der wichtigsten Corneaproteoglykane ermittelt werden, nämlich: Proteokeratansulfat, Proteochondroitinsulfat und Proteoheparansulfat. Anders als in den bisher beschriebenen Untersuchungen wird dabei das Verteilungsmuster den morphologischen Schichten der Cornea zugeordnet: dem Epithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und dem Endothel.

Bisher waren noch nicht für immunhistologische Analysen der Cornea verwendete Antiseren gegen Proteoglykane durch Immunfluoreszenzuntersuchungen an Gefrierschnitten der Cornea getestet worden.

Gleichzeitig soll das qualitative und quantitative Stroma-Proteoglykan-Muster auf biochemische Weise bestimmt werden. Hierzu wird eine einfache Extraktions- und Reinigungs-Prozedur für die Isolierung von Cornea-Proteoglykanen entwickelt und angewandt.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Material

DEAE-Sephacel stammt von der Firma Pharmacia (Heidelberg).

Die Corneae für die Extraktion von Proteoglykanen stammen von frisch geschlachteten Schweinen aus dem Schlachthof.

Die Antiseren stammen aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. Helmut Stuhlsatz und Herrn Dr. Dr. Ruprecht Keller jun. aus der Abteilung Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen. Es handelt sich dabei um:

- Kaninchen-Antiserum gegen corneales Rinderproteokeratansulfat
- Kaninchen-Antiserum gegen Rinderendothel-Proteochondroitinsulfat
- Kaninchen-Antiserum gegen Rinderendothel-Zelloberflächen-Proteoheparansulfat
- Kaninchen-Antiserum gegen Basalmembran-Proteoheparansulfat von HR9-Zellen, einer Mäuse-Teratocarcinomzelllinie

Die Spezifität dieser Antiseren bzw. Antikörper war in Immunblots mit nativen und Lyasen-abgebauten Proteoglykanen als Antigenen gezeigt worden.

Das Rhodamin-markierte Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG stammt von der Firma Sigma (München).

6.2. Methoden

6.2.1. Generelle Methoden

Die Untersuchungen auf Uronsäuren wurden mit der Carbazolmethode (4,17), die Untersuchungen auf Neutralzucker mit der Orcinreaktion (40) durchgeführt. Ultrazentrifugationen wurden in einer Beckmann LS-50 Ultrazentrifuge vorgenommen. Die Untersuchung auf Aminosukker und Aminosäuren erfolgten nach Hydrolyse bei 115° C für 15 h auf einem Biotronic LE-2000 amino acid analyzer.

6.2.2. Isolierung und Charakterisierung von cornealen Stroma-Proteoglykanen

Etwa 1000 Schweine Corneae wurden mit dem Skalpell aus den Augen von frisch geschlachteten Schweinen getrennt und in Aceton bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Corneae wurden in 0,1 M Tris/HCl, 7 M Guanidiniumchlorid, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 7,4 drei Tage bei 4°C extrahiert. Die verbleibenden Gewebsstücke wurden abfiltriert und das Filtrat (etwa 200 ml) mit festem Cäsiumchlorid auf eine Dichte von 1,55 g/ml eingestellt. Diese Lösung wurde 60 Stunden in einem Beckmann 70 TI Rotor bei 150.000 x g (50.000 Upm) und 10°C ultrazentrifugiert.

Das Prinzip der CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationstrennung ist in Abb. 10 dargestellt. CsCl bildet nach längeren Zentrifugationszeiten einen Dichtegradienten. Die Zonen höherer Dichte befinden sich dabei am Boden des Zentrifugationsgefäßes. In diesem Dichtegradienten verteilen sich nun die gelösten Substanzen entsprechend der Dichte ihrer Cs-Salze. Da die Cs-Salze des Proteokeratansulfats eine höhere Dichte aufweisen als die des Proteochondroitinsulfats, liefert die CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bereits eine Vortrennung der cornealen Proteoglykane.

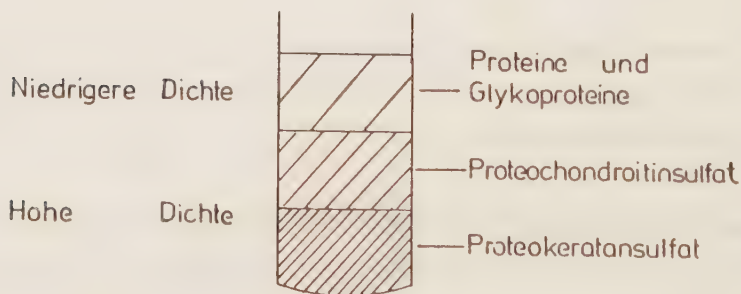


Abb. 10:

Prinzip der CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugationstrennung.
Für nähere Einzelheiten siehe Text.

Die zentrifugierten Lösungen wurden in 17 Fraktionen aufgeteilt, gegen 1 mM PMSF, 1 mM EDTA drei Tage dialysiert und auf Dichte, Aminosucker- und Aminosäuren- Zusammensetzung, Uronsäure- und Neutralzucker-Gehalt untersucht. Es wurden drei Fraktionen zusammengefaßt: Die schwere Fraktion (SF:1-6), die mittlere Fraktion (MF:7-14) und die leichte Fraktion (LF:15-17). Diese Fraktionen wurden getrennt weiter aufgearbeitet.

SF, MF und LF wurden mit festem Harnstoff und fester Tris-Base, sowie 2 M HCl auf 0,1 Tris HCl, 7 M Harnstoff, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 7,4 (Startpuffer) äquilibriert. Die Säulen wurden dann nacheinander mit 30 ml des Startpuffers und einem Gradienten (250 ml + 250 ml) von 0-1,5 M NaCl eluiert. Fraktionen von 8 ml wurden aufgefangen und auf Uronsäure-, Neutralzucker-Gehalt und auf Leitfähigkeit (umgerechnet auf M NaCl) untersucht.

Das Prinzip der DEAE-Sephacel Chromatographie ist in Abb. 11 dargestellt. Danach interagieren bei schwachen Ionenstärken die Proteoglykane mit den positiv geladenen Diethyl-amino bzw. -ammoniumgruppen. Diese Interaktion führt zu einer Fixierung der Proteoglykane an der stationären Gel-Matrix. Bei höheren Ionenstärken, die mit dem sukzessive ansteigenden NaCl-Gradienten zugeführt werden, bilden sich immer mehr Ionenpaare zwischen Natrium und dem Proteoglykan, sowie Chlorid um den Ionenaustauscher aus. Dies führt zu einer Anschwächung der Bindung des Proteoglykans an die Gelmatrix. Bei einer bestimmten Ionenstärke lösen sich dann die Proteoglykane von der Gel-Matrix ab und eluieren mit dem Lösungsmittel aus der Säule.

Zwei Fraktionen aus diesen DEAE-Sephacel-Chromatographien (CSPG und KSPG) wurden drei Tage gegen 1 mM PMSF und 1 mM EDTA dialysiert und dann lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in 30 ml 0,1 M Tris/HCl, 7 M Harnstoff, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 7,4 gelöst und

an DEAE-Sephacel rechromatographiert unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben. Die so gereinigten Substanzen CSPG und KSPG wurden drei Tage gegen 1 mM PMSF und 1mM EDTA dialysiert, in 80 % Ethanol ausgefällt, zweimal mit Wasser/80% Ethanol umgefällt.

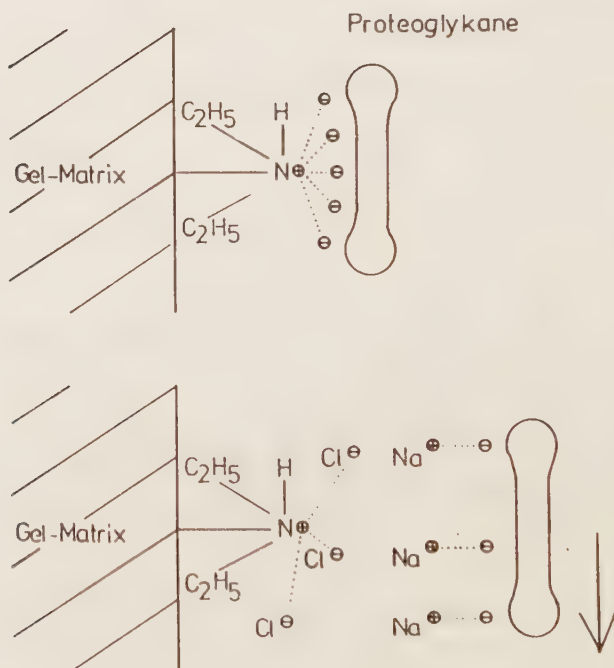


Abb. 11:

Prinzip der DEAE-Sephacel-Chromatographie. Nähere Einzelheiten siehe Text.

6.2.3. Immunhistologische Untersuchungen der Cornea und Retina der Ratte und des Rindes

FrISChe Rinderaugen wurden vom Schlachthof bezogen und die Retina sowie die Cornea wurden mit dem Skalpell präpariert. Zur Herstellung des Rattengewebes wurde eine Whistar-Ratte tief mit Diäthylether narkotisiert, durch Bruch der Nackenwirbelsäule getötet und das Auge in toto präpariert.

Die Gewebsstücke wurden rasch in Einbettmedium überführt und auf -20°C gekühlt. Es wurden im Kryostaten Schnitte von $6\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger gegeben.

Eine Reihe von Fixationen wurden erprobt: 0,5% Formalin in PBS, 1% Formalin in PBS, 2% Formalin in PBS und Aceton. Für die meisten Standarduntersuchungen stellte sich die Fixierung in Aceton als die geeigneteste heraus.

Die Schnitte wurden 30 min mit 10% Rinderserumalbumin (Grade V, Sigma) in PBS inkubiert und dann 2 h mit 1:10 verdünntem Antiserum (mit 10% Albumin in PBS verdünnt) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 10% Albumin in PBS viermal gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Rhodamin-conjugiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG) (1:100 verdünnt mit 10% Albumin in PBS verdünnt) 20 min inkubiert. Die Schnitte wurden dann erneut viermal mit 10 % Albumin in PBS gewaschen, mit 1 Tropfen 50% Glycerin versehen, mit Deckgläsern abgedeckt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss). Die Farbaufnahmen wurden mit einem Kodak 21 Din Film angefertigt.

7. ERGEBNISSE

7.1 Isolierung und teilweise Charakterisierung von Proteoglykanen der Cornea

7.1.1 CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von Proteoglykanen

Das Schema der Isolierung von cornealen Stroma-Proteoglykanen ist in Abb. 12 wiedergegeben.

Etwa 1000 Schweinecorneae wurden mit 4 M Guanidiniumchlorid extrahiert und in Gegenwart von CsCl (mittlere Dichte = 1,55 g/ml) bei $150.000 \times g$ ultrazentrifugiert. 17 Fraktionen verschiedener Dichte wurden aufgefangen und analysiert. Die Daten sind in Abb. 13 wiedergegeben.

Sämtliche Fraktionen wurden auf die Bausteine der darin gelösten Substanzen untersucht: Uronsäure, Neutralzucker, Aminosucker und Aminosäuren. Aus den Daten (siehe Abb. 13) ergibt sich, daß die Fraktion leichtester Dichte (LF:15-17) sich aus Protein-reichen Substanzen zusammensetzt. Es handelt sich dabei um Glykoproteine, die bei dem Extraktionsschritt mit in den löslichen Überstand gelangten. Die mittlere Fraktion (MF:7-14) und die schwere Fraktion (SF:1-6) setzen sich aus Substanzen mit geringerem Proteingehalt und höherem Anteil an Aminosuckern zusammen. Es handelt sich dabei um Fraktionen, in denen die cornealen Proteoglykanen angereichert vorliegen. Da das Strukturelement des Keratansulfats aus GlcNAc und Gal, das des Chondroitinsulfat/Dermatansulfats hingegen aus GalNAc und GlcUA bzw. IdUA besteht, liefert das GlcN/GalN-Verhältnis einen Hinweis auf den relativen Gehalt der Fraktionen an Pro-

Schweine - Corneae

Extraktion mit 4 M Guanidinium - Hydrochlorid

Cäsiumchlorid - Dichtegradienten - Zentrifugation

Schwere Fraktion Mittlere Fraktion Leichte Fraktion

Dialyse

DEAE - Sephacel - Chromatographie

GP GP CSPG KSPG

Dialyse

DEAE - Sephacel - Chromatographie

gereinigte

Proteoglycane:

CSPG

KSPG

Abb. 12:

Schema der Isolierung von cornealen Stroma-Proteoglykanen.

teokeratansulfat und Proteochondroitinsulfat. Man erkennt aus Abb. 13, daß Proteokeratansulfat zwar in allen Fraktionen die vorherrschende Substanz gegenüber Proteochondroitinsulfat und Proteoder-matansulfat ist, sich aber in SF gegenüber allen anderen Fraktionen anreichert

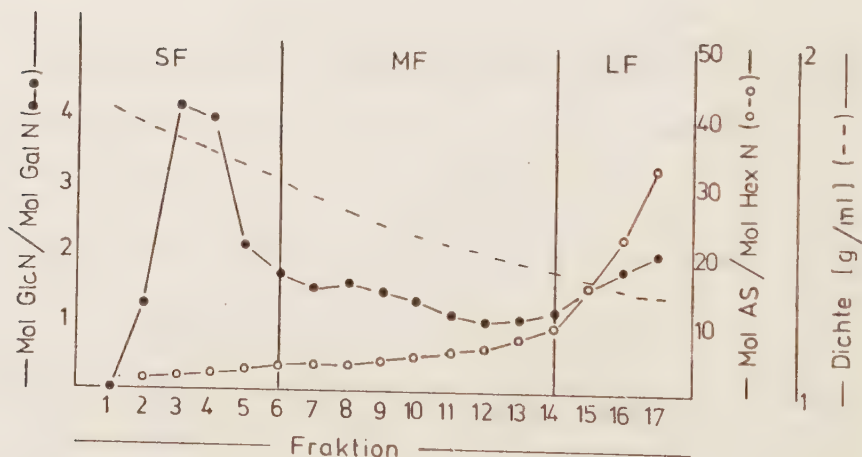


Abb. 13:

CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von cornealen Proteoglykanen.

Extrakte von 1000 Schweinecorneae wurden auf eine Dichte von 1,55 mit CsCl eingestellt und 60 h bei 150.000 x g zentrifugiert. 17 Fraktionen wurden von der Oberfläche des Zentrifugationsröhrchens her entnommen und auf Dichte (---), Aminosucker und Aminosäuren untersucht. (○-○) = Mol GlcN / Mol GalN; (●-●) = Mol Aminosäuren / Mol HexN.

7.1.2. DEAE-Sephacel-Chromatographie der cornealen Proteoglykane

Die drei Ultrazentrifugationsfraktionen LF, MF und SF wurden jeweils an DEAE-Sephacel chromatographiert. Die Chromatographie wurde zur Erhöhung der Ausbeute in 7M Harnstoff durchgeführt. In allen Chromatographien konnten 4 Fraktionen von einander getrennt werden (siehe Abb. 14). Eine Fraktion (GP) wurde beim Auftragen auf die Säule nicht von dem Ionenaustauscher fixiert. Eine zweite Fraktion eluierte am Beginn des NaCl-Gradienten (GP). Eine dritte Fraktion eluierte bei einer Ionenstärke zwischen 0,5 und 0,7 (CSPG) und eine vierte eluierte zwischen 0,7 und 1 M NaCl (KSPG). Das Uronsäureprofil (Carbazolreaktion) zeigt ein Maximum vor allem bei der CSPG-Fraktion. Hieraus läßt sich schließen, daß diese Fraktion vor allem Proteochondroitinsulfat und Proteodermatansulfat enthält, da diese Proteoglykane die einzigen sind, die Uronsäure enthalten. Das Profil des Neutralzucker (Orcinreaktion) zeigt demgegenüber ein Maximum in allen vier Fraktionen. Vor allem aber ist die KSPG-Fraktion reich an Neutralzuckern. Die relativ hohe Ionenstärke, mit der diese Fraktion von der DEAE-Sephacel Säule eluiert wurde sowie die Ergebnisse der Neutralzucker und Uronsäurebestimmungen lassen darauf schließen, daß es sich bei dieser Fraktion um ein angereichertes Proteokeratansulfat handelt.

Die Fraktionen PGCS und PGKS aus den drei CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugationsläufen nach DEAE-Sephacel-Chromatographie wurden erneut an DEAE-Sephacel rechromatographiert. Die schwereren Fraktionen PGCS-Fraktionen ließen sich dabei in zwei Fraktionen auftrennen (siehe Abb. 15). Eine Fraktion eluierte am Beginn des NaCl-Gradienten. Aus der Elutionsposition dieser Substanz, die

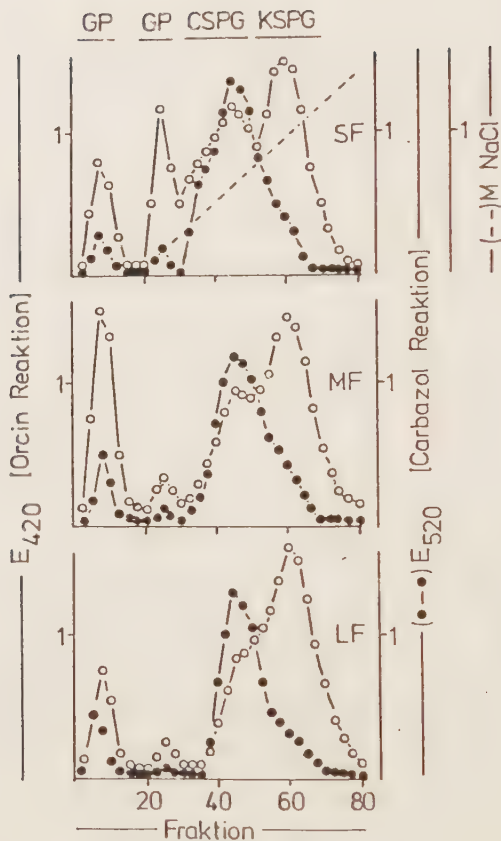


Abb. 14:

Chromatographie an DEAE-Sephacel.

Die schwere Fraktion (SF), die mittlere Fraktion (MF) und die leichte Fraktion (LF) wurden an DEAE-Sephacel in 0,1 M Tris/HCL, 7 M Harnstoff, 1 mM PMSE, 1 mM EDTA pH 7,4 chromatographiert zu dem ein Gradient von 0-1,5 M NaCl addiert wurde. Fraktionen von 8 ml wurden aufgefangen und auf Leitfähigkeit (---, als M NaCl gegeben), Uronsäure (Carbazolreaktion) (•-•) und Neutralzucker (Orcinreaktion) (o-o) untersucht.

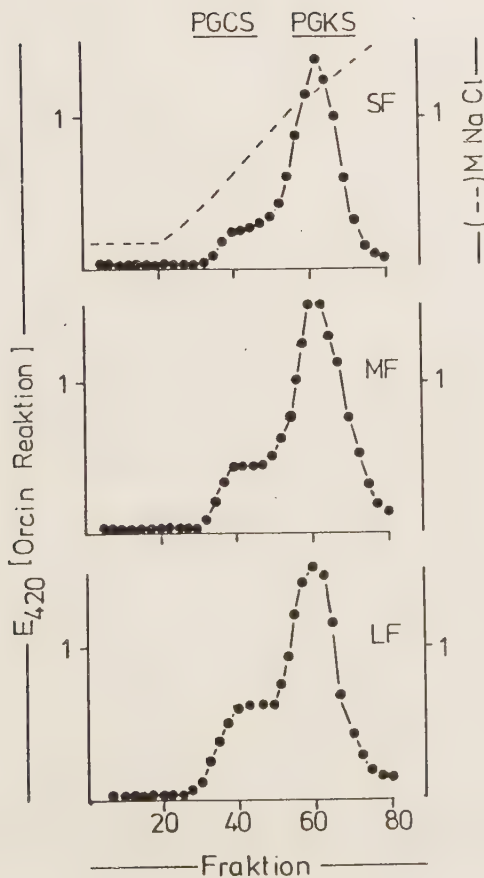


Abb. 15:

Chromatographie an DEAE-Sephacel.

Die PGKS-Fractionen aus der ersten DEAE-Sephacel Chromatographie wurden an DEAE-Sephacel rechromatographiert unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben.

fast kein GlcN mehr enthielt, also fast gar nicht durch Proteokeratansulfat oder durch Glykoproteine verunreinigt war, läßt sich entnehmen, daß es sich hierbei um ein Proteochondroitin handeln muß, daß nur sehr wenige oder gar keine Sulfatgruppen trägt (Zur Bausteinanalyse siehe Tab.3). Die Hauptfraktionen waren immer noch in größerem Umfang durch Proteokeratansulfat verunreinigt. Die Proteokeratansulfatbeimengungen machen 22% in der schweren Fraktion, 44% in der mittleren Fraktion und 31% in der leichteren Fraktion aus (siehe Tab.4). Obwohl hier also eine Anreicherung gegenüber Proteokeratansulfat erreicht werden konnte, ist die Reinigung der Proteochondroitinsulfate an dieser Stelle der Präparation nur unvollständig. Aus den Daten läßt sich entnehmen, daß das Proteochondroitinsulfat einen Proteinanteil von etwa 1:2,5 (Protein/Glykosaminoglykan) aufweist: da jede GalN für ein Disaccharid mit einem Molekulargewicht von etwa 500 Dalton steht und jede Aminosäure für im Mittel 100 Dalton, ergibt sich dieser Wert aus den GalN/1000 Aminosäuren Verhältnis in der schweren Fraktion. Bei einer Anzahl von zwei Glykosaminoglykanketten/Proteochondroitinsulfat und einem Molekulargewicht von 35.000 Dalton/Chondroitinsulfatkette ergibt sich damit rechnerisch ein Wert von etwa 30.000 Dalton für das Coreprotein.

Tab. 3

 SF-CS-PG

Asp/	
1000 As	144
Glu/	
1000 As	132
Leu/	
1000 As	137
GlcN/	
1000 As	21,8
Gal/	
1000 As	435
Mol As/	
Mol Hex N	2,20
GlcN/	
GalN	0,05

Bausteinanalyse des sulfatfreien Proteochondroitins PGC

Tab. 4

	S-CSPG	M-CSPG	L-CSPG
Asp/			
1000 As	113	157	126
Glu/			
1000 As	132	136	140
Leu/			
1000 As	172	142	122
GlcN/			
1000 As	102	71,4	36,9
GalN/			
1000 As	468	164	119
Mol As/			
Mol Hex N	1,76	4,25	6,41
GlcN/			
GalN	0,22	0,44	0,31

Bausteinanalyse der Chondroitinsulfat-Fractionen aus der schweren (S-CSPG), mittleren (M-CSPG) und leichten (L-CSPG) CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach zweimaliger DEAE-Sephacel-Chromatographie.

Die Proteokeratansulfate liegen im Gegensatz zu den Proteochondroitinsulfaten nach der zweiten DEAE-Sephacel-Chromatographie (siehe Abb. 16) hoch angereichert vor (siehe Tab. 5). Die höchste Verunreinigung durch Proteochondroitinsulfat zeigt sich in der leichten Fraktion mit etwa 6%. Nach der gleichen Rechnung, wie oben für die Proteochondroitinsulfate beschrieben, läßt sich für das Proteokeratansulfat der mittleren Fraktion, unter der Annahme von einer Keratansulfatkette mit 24.000 Dalton/Proteokeratansul-

fatmolekül, ein Molekulargewicht von etwa 27.000 Dalton rechnerisch für das Coreprotein des Proteokeratansulfats ermitteln.

Allgemein läßt sich für alle Proteoglykane sagen, daß der Proteinanteil mit geringerer Dichte ansteigt. Dies spiegelt die Heterogenität der Proteoglykane wider, die in Protein-reicheren und Protein-ärmeren Modifikationen vorkommen. Asp, Glu und Leu waren die vorherrschenden Aminosäuren in allen Proteoglykanpräparationen. Ihre Verhältnisse zu der Gesamtaminosäuremenge sind deswegen gesondert aufgeführt.

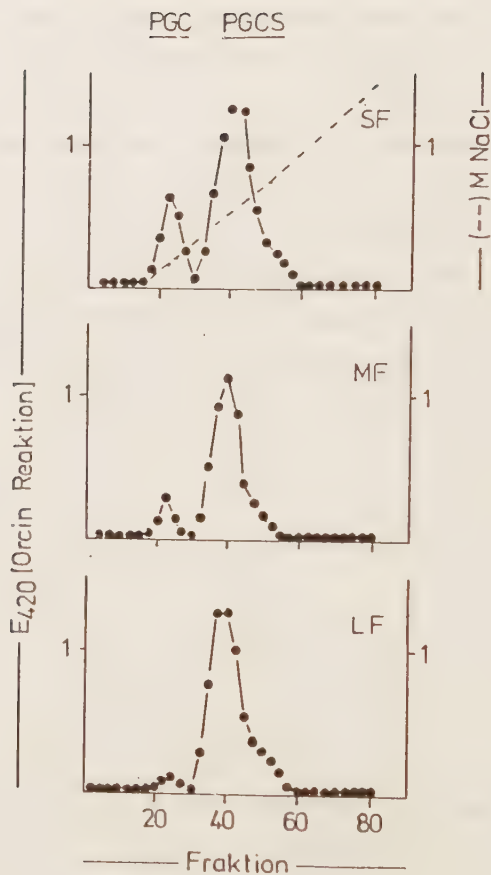


Abb. 16:

Chromatographie an DEAE-Sephacel.

Die PGCS-Fractionen aus der ersten DEAE-Sephacel Chromatographie (siehe Abb. 14) wurden an DEAE-Sephacel rechromatographiert unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben.

Tab. 5

	S-KSPG	M-KSPG	L-KSPG
Asp/			
1000 As	169	165	192
Glu/			
1000 As	127	126	130
Leu/			
1000 As	185	180	134
GlcN/			
1000 As	415	258	229
GalN/			
1000 As	16,9	9,10	13,6
Mol As/			
Mol Hex N	2,31	3,73	4,12
GlcN/			
GalN	24,6	28,5	16,8

Bausteinanalyse der Proteokeratansulfat-Fraktionen aus der schweren (S-PGKS), mittleren (M-KSPG) und leichten (L-KSPG) CsCl-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach zweimaliger DEAE-Sephacel-Chromatographie

7.2. Bestimmung der Gewebslokalisation von cornealen Proteoglykanen durch immunhistologische Untersuchungen

Antiseren gegen Cornea-Proteokeratansulfat, gegen Endothelzell-Plasmamembran-Proteoheparansulfat, gegen Endothelzell-Proteochoondroitinsulfat und gegen Maus-(HR9-Zell)-Basalmembran-Proteoheparansulfat wurden zur immunhistologischen Untersuchung von Cornea-Gefrierschnitten aus Ratten- und Rinderaugen eingesetzt. Als sekundärer Antikörper fand ein Rhodamin-conjugiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Verwendung. Die Vergrößerung in allen dokumentierten Untersuchungen betrug 1:400.

Zur Kontrolle wurden Gewebsschnitte mit Normalserum und zweitem Antikörper, sowie nur mit sekundärem Antikörper gefärbt. Dieses Färbemuster wurde mit dem Muster verglichen, das mit den spezifischen Antiseren erzielt wurde. Bei diesen Kontrollen der unspezifischen Anfärbung durch Normalserum oder durch den sekundären Antikörper konnte regelmäßig eine schwache Anfärbung des Epithels beobachtet werden. Aus diesem Grunde ist die Beurteilung der Epithelanfärbung durch einige Antiseren (Anti-PCS) mit einer Unsicherheit behaftet. In häufigen Wiederholungen und der vergleichenden Beurteilung der Färbemuster aus einer größeren Anzahl unabhängiger Experimente konnte aber im Vergleich zur Kontrolle die Anfärbung des Corneaeppithels in allen Fällen als spezifisch bzw. unspezifisch beurteilt werden.

Proteokeratansulfat wird als Bestandteil des Corneastromas identifiziert (Abb. 17-A). Ähnliche morphologische Zuordnungen wurden bereits früher (65) auf Grund biochemischer Messungen vorgenommen. Bei allen untersuchten Präparaten wurde eine geringe Anfärbung

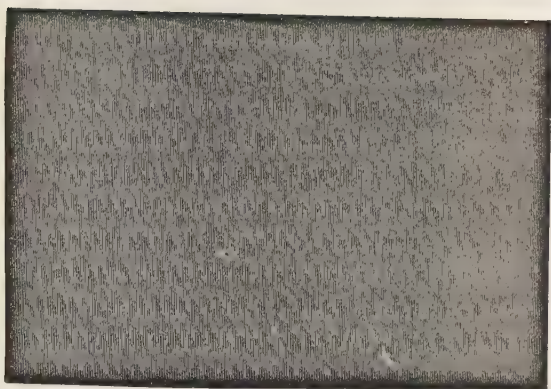
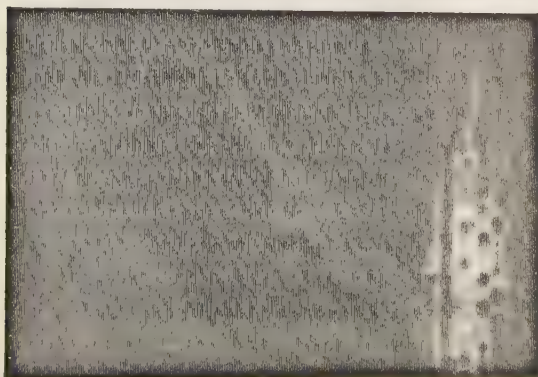


Abb. 17:

Immunhistologische Darstellungen des Rattenauges mit Anti-Rinder-
cornea-Proteokeratansulfat.

A = Rattencornea x 400

B = Rattenretina x 400



der Epithelleiste auf eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers zurückgeführt.

Die Antiseren gegen die beiden Proteoheparansulfate, eines aus der Plasmamembran und eines aus der Basalmembran, zeigen das erwartete Fluoreszenz-Verteilungsmuster, das Anti-Endothelzell-Plasmamembran-Proteoheparansulfat-Antiserum färbt im wesentlichen nur das Epithel und das Endothel an (Abb. 18). Durch das Anti-Basalmembran-Proteoheparansulfat-Antiserum werden die beiden Basalmembranen der Cornea erfaßt (Abb. 19). Bei den hier untersuchten Präparaten ließ sich die unspezifische Anfärbung der Epithelleiste fast vollständig unterdrücken.

Das Antiserum gegen das Endothelzell-Proteochondroitinsulfat (PCS) erfaßt das Endothel und das Epithel der Cornea (Abb. 20). Die Farbintensitäten sind um ein Vielfaches stärker als die, die mit Normalserum bzw. sekundärem Antikörper alleine erzielt werden konnten. Es wird deswegen aus diesen Untersuchungen die Schlußfolgerung gezogen, daß es sich bei diesem Proteoglykantyp um ein nicht mesenchymales niedermolekulares Proteochondroitinsulfat handelt, das sich nur im Endothel bzw. Epithel der Cornea, aber nicht im Corneastroma nachweisen läßt.



Abb. 18:

Immunhistologische Darstellung des Rattenauges mit Anti-Rinderendothel-Zelloberflächen-Proteoheparansulfat.



Abb. 19:

Immunhistologische Darstellung des Rattenauges mit Anti-Maus-Basalmembran-Proteoheparansulfat.

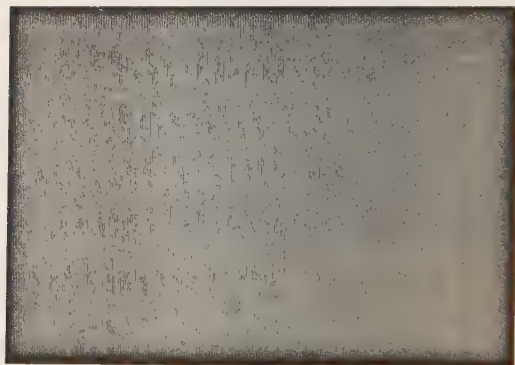


Abb. 20:

Immunhistologische Darstellung des Rattenauges mit Anti-Rinderendothel-Proteoglykandisulfat.

8. DISKUSSION

Vorschlag für einen Atlas der Proteoglykanverteilung in der Cornea

Es wird in dieser Arbeit zum ersten Mal eine direkte Evidenz für die Anwesenheit von Proteoheparansulfat in der Cornea geliefert. Bisher waren Heparansulfat und Proteoheparansulfat in der Cornea nicht beschrieben worden, wohl vor allem, da diese Substanzen gegenüber den anderen Stroma-Proteoglykanen in einer so geringen Konzentration vorliegen, daß sie sich einem klassisch-biochemischen Nachweis entziehen. Durch die immunhistologischen Untersuchungen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, läßt sich weiterhin die Existenz eines nicht-mesenchymalen Proteochondroitinsulfates im Epithel und Endothel der Cornea wahrscheinlich machen. Diese Substanz wurde zum ersten Mal aus kultivierten Gefäßendothelzellen isoliert (20).

Es zeigt sich also eine sehr differenzierte Zuordnung der einzelnen Proteoglykanen zu den morphologischen Schichten der Cornea. Im Epithel und Endothel herrschen Zelloberflächen-Proteoheparansulfat und nicht mesenchymales Proteochondroitinsulfat vor. Die Basalmembranen enthalten das Basalmembran-Proteoheparansulfat. Im Stroma befinden sich Proteokeratansulfat, Proteochondroitinsulfat/Dermatansulfat und Proteochondroitin. Die Existenz eines besonderen Zelloberflächen-Proteoheparansulfat für die Fibroblasten der Cornea muß aus zwei Gründen gefordert werden: zum einen ist bekannt, daß das mesenchymale Proteoheparansulfat eine andere Struktur hat, als das Proteoheparansulfat von Zellen aus anderen Keimblättern, außerdem wurde für in dieser Arbeit verwendete Antiseren gegen Zelloberflächen-Proteoheparansulfat kein Zellspezifische Anfärbung der Fibroblasten gefunden. Dies deckt sich mit den Untersuchungen in anderen Geweben, wie z.B. Haut, Niere und Leber (39).

Selbst unter der Annahme, daß das nicht-mesenchymale Proteochondroitinsulfat, das Zelloberflächen-Proteoheparansulfat aus Endothel und Epithel und das Basalmembran-Proteoheparansulfat aus beiden Basalmembranen der Cornea identische Gen-Produkte sind, so läßt sich für die Cornea doch eine Anzahl von mindestens 6 verschiedenen Proteoglykanen festlegen. Eine schematische Übersicht über die Proteoglykanverteilung in der Cornea gibt Abb. 21.

Ein sehr interessanter Befund ist die Anfärbbarkeit des Epithels durch Antikörper gegen Zelloberflächen-Proteoheparansulfat. Zum einen zeigen zumindest die hier erhobenen morphologischen Befunde, daß die Cornea-Epithelzelle nicht polarisiert ist. D.h. es gibt keine spezifische Verteilung des Glykokalixmoleküls Zelloberflächen-Proteoheparansulfat auf die der Basalmembran oder der Außenseite der Cornea zugewandte Seite. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die z.B. an Leberzellen durchgeführt wurden (42). Hier zeigte sich, daß das Zelloberflächen-Proteoheparansulfat nur auf der sinusoidalen Seite aber nicht auf der kanalikularen Seite der Zelle zu finden ist. Proteoheparansulfat ist deswegen ein potentieller Polaritätsmarker, der im Falle der Cornea eine Nicht-Polarisierung anzeigt.

Zum anderen aber bedeutet der in dieser Arbeit vorgestellte Befund der Anfärbbarkeit des Cornea-Epithels mit Antiserum gegen Zelloberflächen-Proteoheparansulfat, daß die Außenseite der Cornea mit Proteoheparansulfat besetzt ist. Dies wiederum läßt interessante Überlegungen über die Wechselwirkung der äußersten Epithelzellschicht mit den Elementen der Tränenflüssigkeit zu. Es wurde nämlich gezeigt, daß Zelloberflächen-Proteoheparansulfat Sequenzhomologien mit dem Transferrin-Rezeptor aufweist (8). Somit könnte das Transferrin in der Tränenflüssigkeit spezifisch mit dem Proteoheparansulfat der Epithelzelloberfläche interagieren. Auf diese

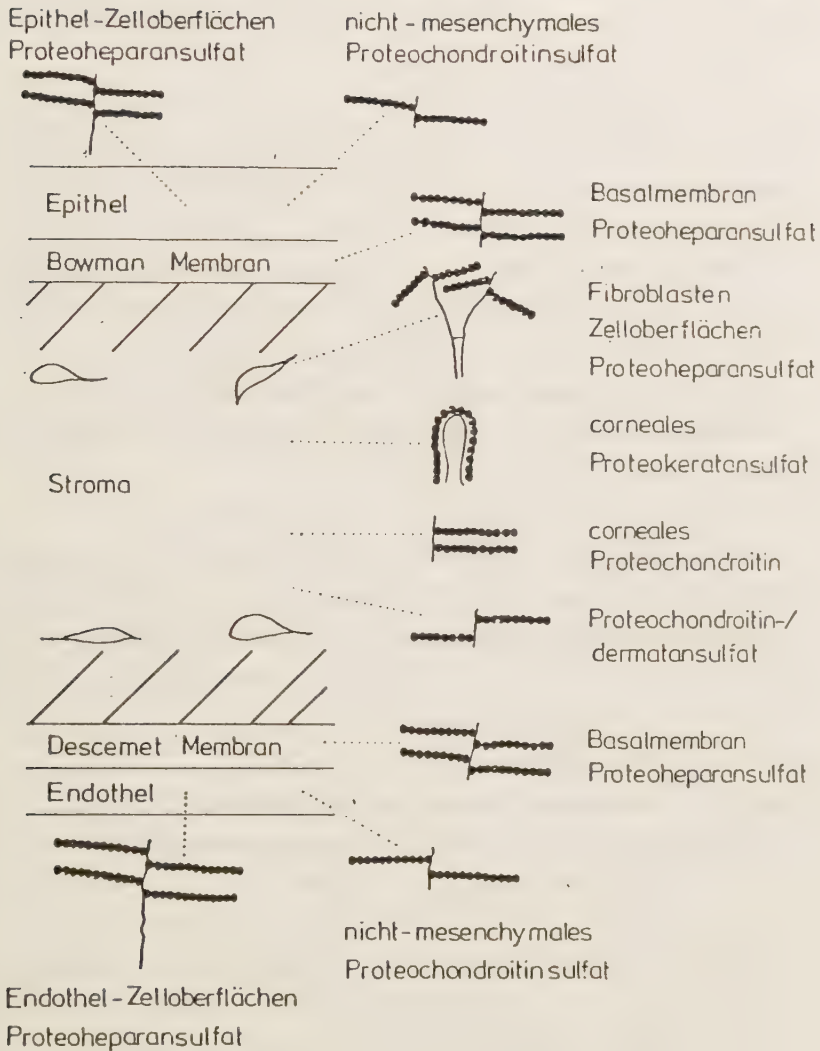


Abb. 21:

Schematische Darstellung der Proteoglykanverteilung in der Cornea.

Weise käme es dann zu einer geregelten Nahordnung von Glykokalix und Proteinen der Tränenflüssigkeit auf der Oberfläche der Cornea. Dies wiederum würde die Ausbildung eines konstanten Tränenfilms auf der Corneaoberfläche erleichtern.

Als Nebenfund kann erwähnt werden, daß die immunhistologischen Anfärbungen der Retina mit den vorhandenen Antiseren sehr schwer zu interpretierende Färbemuster ergaben. Es zeigte sich hier bei den meisten Proteoglykanen ein gleichförmiges Verteilungsmuster, das nur geringe Variationen zwischen den einzelnen Proteoglykanen zeigte. Es scheint dies ein vorläufiges Ergebnis dieser Arbeit zu sein, daß die Proteoglykanverteilung in der Retina nicht ein solch spezifisches Muster für verschiedene morphologische Schichten des Gewebes aufweist, wie die der Cornea.

In der alten Nomenklatur hießen die Proteoglykane und Glykosaminoglykane "Mucopolysaccharide", was sich am ehesten mit "schleimbildende Polysaccharide" übersetzen ließe. Diese Vorstellung von der Struktur und Funktion dieser Substanzklassen mußte inzwischen revidiert werden. Es scheint so zu sein- und dies ist auch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit-, daß Proteoglykane und Glykosaminoglykane genau definierte Strukturen aufweisen und Gewebs- und Zell-spezifische Lokalisationen im Organismus haben.

9. ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus 1000 Schweinecorneae wurden drei verschiedene Stroma-Proteoglykane durch Extraktion mit 4 M Guanidiniumchlorid, Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und zweimaliger DEAE-Sephacel Chromatographie isoliert. Es handelt sich dabei um corneales Proteokeratansulfat, corneales Proteochondroitinsulfat und corneales Proteochondroitinsulfat/Dermatansulfat.

2. Alle Proteoglykane wurden durch Analyse der Aminosäuren- und Aminozyucker-Zusammensetzung teilweise charakterisiert.

3. Mit Antisera gegen corneales Proteokeratansulfat, nicht mesenchymales Proteochondroitinsulfat, Zelloberflächen-Proteoheparansulfat, Basalmembran-Proteoheparansulfat und einen Rezeptor für Basalmembran-Proteoheparansulfat wurden immunhistologische Untersuchungen an Gewebsschnitten von Rinder- und Rattenäugen durchgeführt.

4. Als Ergebnis der immunhistologischen und biochemischen Untersuchungen zu den Proteoglykanen der Cornea läßt sich ein Modell des Verteilungsmuster dieser Substanzen in der Cornea aufstellen. Danach verteilen sich die Proteoglykan-Spezies je nach Typ auf die verschiedenen Schichten der Cornea: Epithel und Endothel, Basalmembranen und Stroma. Ein Zusammenhang zwischen der Spezifität dieser Verteilung und besonderen Funktionen der Proteoglykane in der Cornea wird diskutiert.

10. LITERATURLISTE

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. und
 Watson J.D. : Molecular Biology of the Cell. Garland Pu-
 blishing, Inc. New York and London. Pp. 43, 111, 692 (1983).

2. Axelsson I. und Heinegard D. : Characterization of
 keratan sulfate proteoglycans from bovine corneal stroma.
 Biochem. J. 169: 517 (1978).

3. Benedek B.G. : Theory of transparency of the eye. Appl.
 Optics. 10:459 (1971).

4. Biller T. und Muir A.: A modified uronic acid carbazole
 reaction. Anal. Biochem. 4: 330 (1962).

5. Breckle A. und Mersman J. : The carbohydrate-protein binding
 region in keratan sulfate from bovine cornea. Hoppe-Seyler's
 Z. Physiol. Chem. 361: 31 (1980).

6. Buddecke E. : Grundrisse der Biochemie . 6. Auflage.
 Walter de Gruyter. Pp. 202, 518 (1980).

7. Choi H.U. und Meyer K. : The structure of keratan sul-
 phates from various sources. Biochem. J. 151: 543 (1975).

8. Coster L., Malström A., Carlstedt I. und Fransson L.A.:
 The core protein of fibroblast proteoglycan sulphate
 consists of disulphide-bonded subunits. Biochem. J. 215:
 417 (1983).

9. Davson H. : The hydration of the cornea. *Biochem. J.* 59:24 (1955).
10. Dohlman C.H. : The function of the cornea in health and disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 10:376 (1971).
11. Farrell R.A., McCalley R.L. und Tatham P.E.R. : Wave-length dependencies of light scattering in normal and cold swollen corneas and their structural implications. *J. Physiol. (Lond.)* 233:589 (1976).
12. Fleischer B., Fleischer S. und Ozawa H. : Isolation and characterization of golgi membranes from bovine liver. *J. Cell Biology.* 43: 59 (1969).
13. Fleischer B. : Isolation and characterization of golgi apparatus and membranes from rat liver. *Methods in Enzymology.* 31:180 (1974).
14. Freeman I.L. : Collagen polymorphism in mature rabbit cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17:171 (1978).
15. Fujikawa L.S. : Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab. Invest.* 45:120 (1980).
16. Fujiwara S., Wiedemann H., Timpl R., Lustig A. und Engel J. : Structure and interactions of heparan sulfate proteoglycans from a mouse tumor basement membrane. *Eur. J. Biochem.* 143:145 (1984).

17. Gregory J.D. : The effect of borate on the carbazole reaction. Arch. Biochem. Biophys. 89: 157 (1960).
18. Greiling H., Stuhlsatz H.W. und Kisters R. : Glykosaminoglykan-Peptide aus dem humanen Kniegelenkknorpel. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348: 970 (1967).
19. Hanna C., Bicknell D.S. und O'Brien J.E. : Cell turnover in the adult human eye. Arch. Ophthalmol. 65:695 (1961).
20. Happel R. und Keller R. : Endothelium-cell specific low molecular weight proteochondroitin sulphate. In Vorbereitung (Klinische Chemie RWTH Aachen).
21. Hart G.W., Brew K., Grant G., Bradshaw R.A. und Lennarz W.J. : Effects of Tunicamycin on the biosynthesis of glycosaminoglycans by embryonic chick cartilage. J. Biol. Chem. 253:5795 (1978).
22. Hascall V.C. : Biosynthesis of proteoglycans. J. Supramol. Chem. 24:312 (1978).
23. Hascall V.C. und Hascall G.R. : Cell Biology of Extracellular Matrix. Hay, E.D. (Ed.) New York: Plenum Press Pp. 39 (1982).
24. Hassell J.R., Newsome, D.A., und Hascall V.C. : Characterization and biosynthesis of proteoglycans of corneal stroma from rhesus monkey. J. Biol. Chem. 254:12346 (1979).
25. Hassell J.R. : Macular corneal dystrophy: Failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3705 (1980).

26. Hassell J.R. : Deposits in macular corneal dystrophy contain abnormal proteoglycans. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 20(Suppl.):115 (1981).
27. Hassel J.R. : Proteoglycans changes during restoration of transparency in corneal scars. Biochem. J. (Angenommen zur Publikation).
28. Hay E.D. : Extracellular matrix. J. Cell Biol. 91:205 (1981).
29. Hedbys B.D. : The role of polysaccharids in corneal swelling. Exp. Eye Res. 1:81 (1969).
30. Hodson S. und Miller F. : The bicarbonate ion pump in the endothelium which regulates the hydration of rabbit cornea. J. Physiol. (Lond.) 263:563 (1976).
31. Hooper M.L. und Subak-Sharpe J.H. : Metabolic cooperation between cells. Int. Rev. Cytol. 69:45 (1981).
32. Höök M., Kjellen L., Johansson S. und Robinson J. : Cell surface heparan sulfate Ann. Rev. Biochem. 53:847 (1984).
33. Humphreys S., Humphreys T. und Sano J. : Organization and polysaccharids of sponge aggregation factor. J. Supramol. Struct. 7:339 (1977).
34. Kefalides N., Alper R. und Clark C.C. : Biochemistry and metabolism of basement membranes. Int. Rev. Cytol. 61:433 (1974).

35. Keller R., Stein T., Stuhlsatz H.W., Greiling H., Ohst E., Müller E. und Scherf H.D. : Studies on the linkage region between polysaccharide chain and core protein in bovine corneal proteokeratansulfate. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362: 327 (1981)
36. Keller R., Driesch R., Stein T., Momburg W., Stuhlsatz H.W. und Greiling H. : Biosynthesis of keratan sulfate in bovine cornea (1) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364: 239 (1983).
37. Keller R., Stein T., Weber W., Kehrer T., Stuhlsatz H.W. und Greiling H. : Core protein of chondroitin sulfate proteoglycan. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364: 253 (1983).
38. Keller R., Pratt B., Furthmayr H. und Madri J. : Endotheliumproteoheparansulphate II: Modulation of extracellular matrix. Amer. J. Pathol. (Angenommen zur Publikation).
39. Keller R., Silbart J.E., Furthmayr H., und Madri J. : Endotheliumproteoheparansulphate I: Characterization of different molecular forms. Amer. J. Pathol. (Angenommen zur Publikation).
40. Kesler R.B. : Rapid quantitative anion exchange chromatography of carbohydrates. Anal. Chem. 39: 1416 (1967).
41. Kisters R. und Greiling H. : Zur Struktur von Proteoglykanen aus der Cornea. Anal. Chem. 243: 359 (1968).
42. Kjellen L., Pettersson I. und Höök M. : Binding of heparin and heparan sulfate to rat liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 5371 (1981).

43. Kraemer P. M. : Heparan sulfates of cultured cells. Membrane-associated and cell-sap species in chinese hamster cells. *Biochemistry* 10: 1437 (1971).
44. Kühn K. : Untersuchungen zur Struktur des Kollagens. *Naturwissenschaften* 54:101 (1967).
45. Lambert S. I. und Stoolmiller A. C. : Glycosaminoglycans: a biochemical and clinical review. *J. Invest. Dermatol.* 63:433 (1974).
46. Lehninger A. L. : *Biochemie* VCH (Weinheim) World Publishers New York Pp. 125 (1985).
47. Leibowitz A. : *Corneal Disorders. Clinical Diagnosis and Management.* W. B. Sanders Company. Pp. 20 (1984).
48. Lindahl U. und Höök M. : Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann. Rev. Biochem.* 47:385 (1978).
49. Maurice D. M. und Riley M. V. : The cornea. *Biochemistry of the eye.* C. N. Graymore Ed. New York: Academic. Pp. 497 (1970).
50. Maurice D. M. : The cornea and sclera. *The Eye* (2nd ed.). Davson H. (Ed.) New York: Academic. Pp. 489 (1969).
51. Miller E. J. und Gay S. : Collagen: an overview. *Methods in Enzymol.* 82:3 (1982).

52. Morre D.J. : Isolation of Golgi Apparatus. *Methods in Enzymol.* 22:130 (1971).
53. Newsome D.A., : Direction of specific collagen types normal and keratokonus corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:376 (1982).
54. Newsome D.A., Gross J., und Hassell J.R. : Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:376 (1982).
55. Piez K.A. und Miller A. : The structure of collagen fibrils. *J. Supramol. Struct.* 2:121 (1974).
56. Reim M. und Turss R.R. : Über Metabolitspiegel in Cornea-Endothel und Kammerwasser beim Rind. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 176:252 (1968).
57. Roden L. : Structure and metabolism of connective tissue. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* W.J. Lennarz, Ed. New York: Plenum. Pp. 267 (1980).
58. Schachter H., Jabbal J., Hudgin R.L., Pinteric L., McGuire E.J. und Roseman S. : Structure and metabolism of the proteoglycans of chondroitinsulfats and keratansulfats. *Chemistry.* 2:797 (1970).
59. Schwartz N.B. : Chondroitin sulfate glycosyltransferases in cultured chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 250:5200 (1975).
60. Schwartz N.B., Roden L. und Dorfman A. : Biosynthesis of chondroitin sulfate. *Carbohydr. Res.* 37:167 (1974).

61. Schmut D. : The identification of type II collagen in calf and bovine cornea and sclera. *Exp. Eye Res.* 25:505 (1977).
62. Sheridan J.D. : Cell coupling and cell communication during embryogenesis. *Cell surface reviews*. Poste G., Nicholson G.L. (Eds.) Elsevier. (Amsterdam) Vol I Pp.409 (1972).
63. Silbert J.E. und Freilich L.S. : Biosynthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* 44:676 (1969).
64. Spiro R.G. : Glycoproteins: Their biochemistry, biology and role in human disease. *N. Engl. J. Med.* 281:991, 1043 (1969).
65. Stuhlsatz H.W. : Habilitationsschrift: Zur Struktur und Pathobiochemie keratansulfathaltiger Proteoglykane. RWTH Aachen (1979).
66. Sundar-Raj C.V., Freeman I.L. und Brown S.I. : Selective growth of rabbit corneal epithelium cells in culture and basement membrane synthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19:1222 (1980).
67. Tr  lstad R.L. : Cell biology of the extracellular matrix. Hay, E.D. (Ed) New York: Plenum Press (1982).
68. Wagner R.R. und Cynkin M.A. : Glycoprotein biosynthesis. Incorporation of glycosyl groups into endogenous acceptors in golgi apparatus-rich fraction of liver. *J. Biol. Chem.* 246:143 (1971).

69. Yamada K. M. und Olden K. : Fibronectin-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275:179 (1978).
70. Young R. W. : The role of the golgi complex in sulfate metabolism. *J. Cell Biol.* 57:175 (1973).
71. Yurchenko P. und Furthmayr H. : Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry* 23: 1839 (1984).
72. Zucker B. : Hydration and transparency of corneal stroma. *Arch. Ophthalmol.* 75:228 (1966).

NACHWORT

Herrn Prof. Dr. med. O.-E. Lund danke ich für die Überlassung des Themas.

Für die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung danke ich Herrn Dr. med. Dipl. Chem. O.-F. Scheiffarth.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Dr. R. Keller, der mir die verschiedenen Antiseren zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stellte.

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

As	: Aminosäure
Asn	: Asparagin
Asp	: Asparaginsäure
CS	: Chondroitinsulfat
CS4	: Chondroitin-4-sulfat
CS6	: Chondroitin-6-sulfat
CSPG	: Proteochondroitinsulfat
DS	: Dermatansulfat
EDTA	: Ethylendiaminotetraessigsäure
GAG	: Glykosaminoglykane
Gal	: Galaktose
GlcNAc	: N-Acetylglucosamin
GlcUA	: Glucuronsäure
Glu	: Glutamin
HA	: Hyaluronat
HEP	: Heparin
HR9-Zellen	: Maus-Teratocarcinom-Zellen
HS	: Heparansulfat
IdUA	: Iduronsäure
KS	: Keratansulfat
KSPG	: Proteokeratansulfat
Leu	: Leucin
LF	: Leichte Fraktion
Man	: Mannose
MF	: Mittlere Fraktion
PMSF	: Phenylmethylsulfonylamin
PBS	: Uridin-5-diphosphat
RWTH	: Rheinisch- Westfälische-Technische Hochschule
SF	: Schwere Fraktion (Aachen)
Tris	: Tris(hydroxymethyl)amino-methan
UDP	: Uridin-5-diphosphat

LEBENS LAUF

14 Mai	1959	geboren in Valparaiso/Chile als Tochter des Universitäts-Professors Prof. Dr. phyl. habil. Arnold Keller und seiner Frau Clair Keller, geborene Lippold
März	1966	eingeschult in die Deutsche Schule in Vina del Mar/Chile
März	1972	Wechsel in die Deutsche Schule in Valparaiso/Chile
Sept.	1977	Prueba de Aptitud Academica (entspricht dem deutschen Abitur)
März	1978	Immatrikulation an der Universidad de Chile in Valparaiso für das Medizinstudium
Dez.	1984	Titelverleihung "Medico Cirujano" (chilenischer Ärztetitel)
Juni	1985	Erteilung der deutschen Approbation als Arzt
Juni	1985	Beginn der Facharztausbildung an der Augenklinik der Lud.-Max.-Universität München
Okt.	1985	Immatrikulation an der Lud.-Max.-Universität München zur Dissertation im Fach Humanmedizin

